

09/202791  
PCT/JP97/02221

07.08.97

日 本 国 特 許 庁  
PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D	30 SEP 1997
WIPO	PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application:

1996年 6月26日

出 願 番 号  
Application Number:

平成 8年特許願第200918号

出 願 人  
Applicant(s):

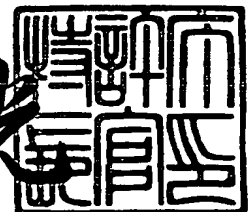
中外製薬株式会社

PRIORITY DOCUMENT

1997年 9月12日

特 許 庁 長 官  
Commissioner,  
Patent Office

荒井 寿光



出証番号 出証特平09-3071935

【書類名】 特許願

【整理番号】 P8-2196

【提出日】 平成 8年 6月26日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 A61K 39/395

【発明の名称】 抗 I L - 8 抗体を有効成分として含有する間接的原因に  
起因する急性肺損傷治療剤

【請求項の数】 12

【発明者】

    【住所又は居所】 石川県金沢市つつじが丘 2 1 0 - 9

    【氏名】 松島 綱治

【発明者】

    【住所又は居所】 石川県金沢市野町 2 - 4 - 5

    【氏名】 横井 健二

【特許出願人】

    【識別番号】 000003311

    【郵便番号】 115

    【住所又は居所】 東京都北区浮間 5 丁目 5 番 1 号

    【氏名又は名称】 中外製薬株式会社

    【代表者】 永山 治

    【連絡先】 郵便番号 1 7 1 住所又は居所 東京都豊島区高田 3  
丁目 4 1 番 8 号 氏名又は名称 中外製薬株式会社 知  
的財産部 電話番号 0 3 ( 3 9 8 7 ) 7 1 1 1

【提出物件の目録】

    【物件名】 明細書 1

    【物件名】 図面 1

    【物件名】 要約書 1

【書類名】 明細書

【発明の名称】 抗IL-8抗体を有効成分として含有する間接的原因に起因する急性肺損傷治療剤

【特許請求の範囲】

【請求項1】 抗IL-8抗体を有効成分として含有する、間接的原因に起因する急性肺損傷治療剤。

【請求項2】 急性肺損傷が急性呼吸促迫症候群であることを特徴とする、請求項1に記載の治療剤。

【請求項3】 急性肺損傷が成人呼吸促迫症候群であることを特徴とする、請求項1に記載の治療剤。

【請求項4】 間接的原因が敗血症症候群であることを特徴とする請求項1、2および3のいずれか1項に記載の治療剤。

【請求項5】 間接的原因が胸郭外の重症な外傷であることを特徴とする請求項1、2および3のいずれか1項に記載の治療剤。

【請求項6】 間接的原因が救急蘇生時の過剰輸液であることを特徴とする請求項1、2および3のいずれか1項に記載の治療剤。

【請求項7】 抗IL-8抗体がモノクローナル抗体であることを特徴する請求項1に記載の治療剤。

【請求項8】 抗IL-8抗体が哺乳類のIL-8に対する抗体であることを特徴する請求項1に記載の治療剤。

【請求項9】 抗IL-8抗体がヒトIL-8に対する抗体であることを特徴する請求項1に記載の治療剤。

【請求項10】 抗IL-8抗体がWS-4抗体であることを特徴する請求項1に記載の治療剤。

【請求項11】 抗IL-8抗体が再構成ヒト化またはキメラ化された抗体であることを特徴とする請求項1に記載の治療剤。

【請求項12】 抗IL-8抗体が再構成ヒトWS-4抗体であることを特徴とする請求項1に記載の治療剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は抗インターロイキン-8 (IL-8) 抗体を有効成分として含有する、間接的原因に起因する急性肺損傷治療剤に関する。さらに詳しくは、本発明は抗IL-8抗体を有効成分として含有する、敗血症症候群等に起因する急性呼吸促進症候群治療剤および成人呼吸促進症候群治療剤に関する。

【0002】

【従来の技術】

IL-8は、C-X-Cケモカインサブファミリーに属する蛋白質であり、以前は好中球活性化因子 (neutrophil activating factor)、単球由来好中球遊走因子 (monocyte-derived neutrophil chemotactic factor) と呼称されていた。IL-8は、好中球を活性化させ好中球に遊走能を獲得させる因子であり、IL-1、TNF等の炎症性サイトカイン (Koch, A. E. et al., J. Invest. Medicine (1995) 43, 28-38、Larsen, C. G. et al., Immunology (1989) 68, 31-36) やPMA、LPS等のマイトゲン (Yoshimura, T. et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1987) 84, 9233-9237)、さらにはカドミウム等の重金属 (Horiguchi, H. et al. Lymphokine Cytokine. Res. (1993) 12, 421-428) によって産生誘導される。

【0003】

急性肺損傷 (Acute lung Injury) は、1994年に米国胸部疾患学会と欧州集中治療医学会の合意委員会によって提唱された新しい定義である (Bernard, G. R. et al, Am. J. Respir. Crit. Care Med. (1994) 149, 818-824)。臨床像として、急性発症の経過をたどり、低酸素血症、胸部X線写真において両側びまん性の浸潤陰影を認め、これらの臨床所見が左房または肺毛細管高血圧に起因していないと考えられる疾患である。

【0004】

急性肺損傷の低酸素血症の具体的な程度としては、呼吸機能の指標である  $p a_{O_2} / F_{I O_2}$  値が300mmHg以下で定義されるが、急性肺損傷のうち、低酸素血症の程度がより重篤なもの（具体的には  $p a_{O_2} / F_{I O_2}$  値が200mmHg以下）は急性呼吸促迫症候群（Acute Respiratory Distress Syndrome）と診断され、従来の成人呼吸促迫症候群（Adult Respiratory Distress Syndrome）とほぼ同一の病態を示す。成人呼吸促迫症候群の病態が成人のみならず小児にも見られるため、成人呼吸促迫症候群の名称を急性呼吸促迫症候群に戻すことが提唱されている。

【0005】

急性呼吸促迫症候群あるいは成人呼吸促迫症候群の病態は肺微小血管内皮の傷害に基づく透過性亢進による肺水腫であり、重篤な呼吸不全で死亡率は60%前後と高率である（Matthay, M. A. et al, Clin. Chest Med. (1990) 11, 575-580）。また、14日以内の死亡例が多い。急性呼吸促迫症候群あるいは成人呼吸促迫症候を誘導する原因には肺自体に発生して肺を直接的に傷害する直接的原因と全身性に生じて間接的に肺を傷害する間接的原因に大別される（Bernard, G. R. et al, Am. J. Respir. Crit. Care Med. (1994) 149, 818-824）。

【0006】

直接原因としては誤嚥、びまん性の呼吸器感染症、溺水、刺激性ガス吸入、肺挫傷が分類され、間接的原因としては、敗血症症候群、胸郭外の重症な外傷、救急蘇生時の過剰輸液ならびに、稀ではあるが人工心肺術後が分類される。これらの原因のうち、頻度が高く予後不良なのが敗血症症候群である（Montgomery, A. B. et al, Am. Rev. Respir. Dis. (1985) 132, 485-489、Knaus, W. A. et al, Am. J. Respir. Crit. Care Med. (1994) 150, 311-317）。敗血症症候群はBone, R. C. ら（Ann. Intern. Med. (

1991) 114, 332-333) によって一般的に定義されているが、米国胸部疾患学会と欧州集中治療医学会の合意委員会による提唱では全身性炎症反応と臓器系不全徴候の両者の特徴を有するものと定められ、必ずしも感染症としての臨床所見は得られなくとも良い。

【0007】

急性呼吸促迫症候群あるいは成人呼吸促迫症候は種々の原因疾患に続発するため、発症機序の解明は未だ確立されておらず、様々な局面からの解明が行なわれている。種々の原因疾患に基づいた何らかの刺激によりある攻撃因子が活性化され、肺の損傷過程が開始されると想定されている。

【0008】

攻撃因子は液性因子と細胞性成分に大別され、液性因子としてはIL-1 (Suter, P. M. et al, Am. Rev. Respir. Dis. (1992) 145, 427-432)、IL-6 (Meduri, G. U. et al, Chest (1995) 108, 1315-1325)、IL-8 (Miller, E. J. et al, Am. Rev. Respir. Dis. (1992) 146, 1016-1022)、TNF- $\alpha$  (Marks, J. D. et al, Am. Rev. Respir. Dis. (1990) 141, 94-97)等のサイトカイン、補体 (Hammerschmidt, D. E. et al, Lancet (1980) 1 (8175), 947-949)、蛋白分解酵素 (Farjanel, J. et al, Am. Rev. Respir. Dis. (1993) 147, 1091-1099)、アラキドン酸代謝産物 (Stephenson, A. H. et al, Am. Rev. Respir. Dis. (1988) 138, 714-719)、PAF (Matsumoto, K. et al, Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. (1992) 19, 509-515)、活性酸素 (Leff, J. A. et al, Am. Rev. Respir. Dis. (1992) 146, 985-989)等の多くの因子が、細胞性成分としては好中球 (Weiland, J. E. et al, Am. Rev. Respir. Dis. (1986) 133, 218-225)や肺胞マクロファージ (Tran Van Nhieu, J. et al, A

m. Rev. Respir. Dis. (1993) 147, 1585-1589) が、患者の気管支肺胞洗浄液あるいは末梢血等より検出されることから攻撃因子として想定されている。

【0009】

これらの攻撃因子が相互に関連して複雑なネットワークを形成していると推測され、このことがこれらの疾患の病態を複雑にし、治療を困難にさせている理由と考えられている。一方で、これらの攻撃因子の中には生体にとって防御的、すなわち損傷を軽減したりもしくは修復機転として作用する因子もある。従って、どの攻撃因子を標的に治療方法確立すべきなのか未だ明確にはなっていない。

【0010】

原因疾患の中で頻度が多く注目されているのは、間接的原因のひとつであるグラム陰性菌による敗血症で、この場合の刺激物質としてはエンドトキシンがよく知られている。一方、直接的原因の一つひとつである誤嚥を、塩酸吸入により再現した肺傷害モデルにおいては、抗IL-8抗体が有効であることが示されていたが(Folkesson, H. G. et al, J. Clin. Invest. (1995), 107-116)、敗血症症候群等のように全身性に生じて間接的に肺を傷害する間接的原因による急性肺損傷に対して、抗IL-8抗体が治療効果を有することは何ら知られておらず、示唆さえされていなかった。

【0011】

【発明が解決しようとする課題】

これら間接的原因に起因する疾患を治療することにより、患者の生命予後の改善を期待できる。現在のところこれらの疾患に対する治療方法は、生命維持の為の対症療法に依存し、肺損傷自体を阻止しまたは修復を進める治療ではない。また、これらの対症療法の効果はほとんどの場合一過性であり、成人呼吸促迫症候群の死亡率は現在でも60%前後と高率である(Matthay, M. A. et al, Clin. Chest. Med. (1990) 11, 575-580)。

【0012】

従って、急性肺損傷に対する治療剤として、新しい薬剤を開発することが望まれている。期待されていたステロイドも成人呼吸促迫症候群の発症予防にも、また、発症後の成人呼吸促迫症候群に対しても効果がないと考えられている（金沢実ら、救急医学（1991）15、753-760）。

従って、本発明の目的は、前記の課題を解決した新しい治療剤を提供することである。

#### 【0013】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明者らは、かかる治療剤を提供すべく鋭意研究を重ねた結果、抗IL-8抗体により、所期の目的が達成されることを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は抗IL-8抗体を有効成分として含有する、前述のような間接的原因に起因する急性肺損傷治療剤を提供する。また、本発明は抗IL-8抗体を有効成分として含有する、間接的原因に起因する急性呼吸促迫症候群治療剤を提供する。また、本発明は抗IL-8抗体を有効成分として含有する、間接的原因に起因する成人呼吸促迫症候群治療剤を提供する。

#### 【0014】

本発明で治療の対象となる急性肺損傷とは、急性発症の経過をたどり、低酸素血症、胸部X線写真において両側びまん性の浸潤陰影を認め、これらの臨床所見が左房または肺毛細管高血圧に起因していないと考えられる疾患である。この疾患は、肺自体に発生する直接的原因と全身性に生ずる間接的原因に起因するものがあるが、それらはその発症機序において大きく異なっている。

#### 【0015】

直接的原因に分類される誤嚥を例に挙げると、胃内容物を嘔吐し、何らかの原因で嘔吐物が気道に混入した場合、胃酸が直接的に気道粘膜、気道上皮細胞および肺胞上皮細胞等を傷害し、急性肺損傷を誘導する。すなわち、直接的原因に起因する急性肺損傷は、体外に通ずる側からの侵襲により発症が誘導される。一方、間接的原因に分類される敗血症を例に挙げると、エンドトキシンあるいはリポポリサッカライド（LPS）等が損傷を誘導する刺激因子となる。エンドトキシ



ン等は血液中で炎症反応を惹起し、補体、凝固線溶系の活性化、サイトカイン産生等を誘導する。これらの二次的な反応が加わって、発症が誘導される。すなわち、間接的原因に起因する急性肺損傷は、血管内からの攻撃により発症が誘導される。

【0016】

本発明で使用する抗IL-8抗体は、間接的原因に起因する急性呼吸促進症候群および成人呼吸促進症候群等の急性肺損傷の治療効果を有するものであれば、その由来、種類（モノクローナル、ポリクローナル）および形状を問わない。

本発明で使用する抗IL-8抗体は、公知の手段を用いてポリクローナルまたはモノクローナル抗体として得ることができる。しかしながら、本発明で 사용되는抗IL-8抗体は、特に哺乳動物由来のモノクローナル抗体が好ましい。この抗体はIL-8と結合することにより、IL-8の生物学的活性を阻害する抗体であり、より好ましくは、IL-8と結合することによりIL-8の好中球への結合を阻害してIL-8のシグナル伝達を遮断し、IL-8の生物学的活性を阻害する抗体である。

【0017】

モノクローナル抗体の産生細胞の動物種は哺乳類であれば特に制限されず、ヒトまたはヒト以外の哺乳動物由来であってよい。ヒト以外の哺乳動物由来のモノクローナル抗体としては、その作製の簡便さからウサギあるいはげっ歯類由来のモノクローナル抗体が好ましい。げっ歯類としては、特に制限されないが、マウス、ラット、ハムスター等が特に好ましく例示される。

【0018】

このような抗IL-8抗体としては、WS-4抗体（Ko, Y. et al., J. Immunol. Methods (1992) 149, 227-235）やDM/C7抗体（Mulligan, M. S. et al., J. Immunol. (1993) 150, 5585-5595）、Pep-1抗体およびPep-3抗体（国際特許出願公開番号WO92-04372）または6G4. 2. 5抗体およびA5. 12. 14抗体（国際特許出願公開番号WO95-23865）、Boylan, A. M. et al., J. Clin. Invest. (19

92) 89, 1257-1267) 等が知られている。これらのうちで、特にWS-4抗体が好ましい。

【0019】

モノクローナル抗体は、基本的には公知技術を使用し、以下のようにして作製できる。すなわち、IL-8を感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法に従って免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、モノクローナルな抗体産生細胞をスクリーニングすることによって作製できる。

【0020】

より具体的には、モノクローナル抗体を作製するには次のようにすればよい。例えば、抗体取得の感作抗原として使用されるヒトIL-8は、Matsushima, K. et al, J. Med. Exp. (1988) 167, 1883-1893に、ウサギIL-8はHarada, A. Int. Immunol. (1993) 5, 681-690に開示されたIL-8遺伝子配列を用いることによって得られる。ヒトIL-8は、種々の細胞で産生され、N末端において異なるプロセッシングを受けることが報告されている(Leonard, E. J. et al., Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. (1990) 2, 479-486)。これまでに、79、77、72、71、70および69のアミノ酸残基数を有するIL-8が知られているが、本発明で使用される抗IL-8抗体取得のための抗原として使用され得る限りその種類を問わない。

【0021】

IL-8の遺伝子配列を公知の発現ベクター系に挿入して適当な宿主細胞を形質転換させた後、その宿主細胞中または、培養上清中から目的のIL-8タンパク質を精製し、この精製IL-8タンパク質を感作抗原として用いればよい。

感作抗原で免疫される哺乳動物としては、特に限定されるものではないが、細胞融合に使用する親細胞との適合性を考慮して選択するのが好ましく、一般的にはマウス、ラット、ハムスター、ウサギ等が使用される。

【0022】

感作抗原を動物に免疫するには、公知の方法に従って行われる。例えば、一般

的方法として、感作抗原を哺乳動物の腹腔内または、皮下に注射することにより行われる。具体的には、感作抗原をPBS (Phosphate-Buffered Saline) や生理食塩水等で適量に希釈、懸濁したものを所望により通常のアジュバント、例えば、フロイント完全アジュバントに適量混合し、乳化後、哺乳動物に4-21毎に数回投与するのが好ましい。また、感作抗原免疫時に適当な担体を使用することができる。

【0023】

このように免疫し、血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを確認した後に、哺乳動物から免疫細胞が取り出され、細胞融合に付されるが、好ましい免疫細胞としては、特に脾細胞が挙げられる。

【0024】

前記免疫細胞と融合される他方の親細胞としての哺乳動物のミエローマ細胞は、すでに、公知の種々の細胞株、例えば、P3 (P3x63Ag8.653) (J. Immunol. (1979) 123, 1548-1550)、p3-U1 (Current Topics in Microbiology and Immunology (1978) 81, 1-7)、NS-1 (Kohler, G. and Milstein, C. Eur. J. Immunol. (1976) 6, 511-519)、MPC-11 (Margulies, D. H. et al., Cell (1976) 8, 405-415)、SP2/0 (Shulman, M. et al., Nature (1978) 276, 269-270)、FO (de St. Groth, S. F. et al., J. Immunol. Methods (1980) 35, 1-21)、S194 (Trowbridge, I. S. J. Exp. Med. (1978) 148, 313-323)、R210 (Galfre, G. et al., Nature (1979) 277, 131-133) 等が好適に使用される。

【0025】

前記免疫細胞とミエローマ細胞の細胞融合は基本的には公知の方法、例えば、ミルステインらの方法 (Kohler, G. and Milstein, C., Methods Enzymol. (1981) 73, 3-46) 等に準じて行

うことができる。

より具体的には、前記細胞融合は例えば、細胞融合促進剤の存在下に通常の栄養培養液中で実施される。融合促進剤としては例えば、ポリエチレングリコール（PEG）、センダイウィルス（HVJ）等が使用され、更に所望により融合効率を高めるためにジメチルスルホキシド等の補助剤を添加使用することもできる。

【0026】

免疫細胞とミエローマ細胞との使用割合は、例えば、ミエローマ細胞に対して免疫細胞を1-10倍とするのが好ましい。前記細胞融合に用いる培養液としては、例えば、前記ミエローマ細胞株の増殖に好適なRPMI 1640培養液、MEM培養液、その他、この種の細胞培養に用いられる通常の培養液が使用可能であり、さらに、牛胎児血清（FCS）等の血清補液を併用することもできる。

【0027】

細胞融合は、前記免疫細胞とミエローマ細胞との所定量を前記培養液中でよく混合し、予め、37℃程度に加温したPEG溶液、例えば、平均分子量1000-6000程度のPEG溶液を通常、30-60%（w/v）の濃度で添加し、混合することによって目的とする融合細胞（ハイブリドーマ）が形成される。続いて、適当な培養液を逐次添加し、遠心して上清を除去する操作を繰り返すことによりハイブリドーマの生育に好ましくない細胞融合剤等を除去できる。

【0028】

当該ハイブリドーマは、通常の選択培養液、例えば、HAT培養液（ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培養液）で培養することにより選択される。当該HAT培養液での培養は、目的とするハイブリドーマ以外の細胞（非融合細胞）が死滅するのに十分な時間、通常数日～数週間継続する。ついで、通常の限界希釈法を実施し、目的とする抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングおよび単一クローン化が行われる。

【0029】

また、ヒト以外の動物に抗原を免疫して上記ハイブリドーマを得る他に、ヒトリンパ球を*in vitro*でIL-8に感作し、感作リンパ球をヒト由来の永

久分裂能を有するミエローマ細胞と融合させ、IL-8への結合活性を有する所望のヒト抗体を得ることもできる（特公平1-59878参照）。さらに、ヒト抗体遺伝子の全てのレパートリーを有するトランスジェニック動物に抗原となるIL-8を投与し抗IL-8抗体産生細胞を取得し、これを不死化させた細胞からIL-8に対するヒト抗体を取得してもよい（国際特許出願公開番号WO94/25585、WO93/12227、WO92/03918およびWO94/02602参照）。

【0030】

このようにして作製されるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、通常の培養液中で継代培養することが可能であり、また、液体窒素中で長期保存することが可能である。

【0031】

当該ハイブリドーマからモノクローナル抗体を取得するには、当該ハイブリドーマを通常の方法にしたがい培養し、その培養上清として得る方法、あるいはハイブリドーマをこれと適合性がある哺乳動物に投与して増殖させ、その腹水として得る方法等が採用される。前者の方法は、高純度の抗体を得るのに適しており、一方、後者の方法は、抗体の大量生産に適している。

【0032】

また、モノクローナル抗体は、抗原を免疫して得られる抗体産生細胞を細胞融合させて生ずるハイブリドーマから得られるものだけでなく、抗体遺伝子をハイブリドーマからクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを公知の細胞株、例えば、COS、CHO、BHK (Baby Hamster Kidney) 細胞、Vero細胞、glioma細胞等の哺乳動物細胞、昆虫細胞、さらには単細胞真核生物である酵母等に導入し、遺伝子組換え技術を用いて産生させたモノクローナル抗体を用いることができる（例えば、Vandamme, A. M. et al., Eur. J. Biochem. (1990) 192, 767-775, 1990、Colcher, D. et al., Cancer Research (1989) 49, 1738-1745、Neumaier, M. et al., Cancer Research (1990) 50, 2128-

2134、De Waele, P. et al., Eur. J. Biochem. (1988) 176, 287-295、Horwitz, A. H. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988) 85, 8678-8682、Wood, C. R. et al., Nature (1985) 314, 446-449、Robinson, R. R. et al., Proc. Am. Assoc. Cancer Res. (1989) 30, 396, 1574、Horwitz, A. H. et al., Euro. J. Cancer (1990) 26, 1009、Carayannopoulos, L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1994) 91, 8348-8352参照)。この場合、ハイブリドーマからクローニングした遺伝子をベクターに挿入して宿主細胞に導入すればよい。

【0033】

本発明に使用されるモノクローナル抗体は、ハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体や、遺伝子組換え型抗体に限られるものではなく、ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に改変したものを使用できる。例えば、ヒト以外の哺乳動物、例えば、マウスのモノクローナル抗体の可変領域とヒト抗体の定常領域とからなるキメラ抗体を使用することができ、このようなキメラ抗体は、既知のキメラ抗体の製造方法、特に遺伝子組換え技法を用いて製造することができる（欧州特許出願公開番号EP125023参照）。

【0034】

さらに、再構成 (reshaped) したヒト抗体を本発明に用いることができる。再構成ヒト抗体は、ヒト以外の哺乳動物、例えばマウス抗体の相補性決定領域 (CDR; complementarity determining region) をヒト抗体の相補性決定領域へ移植したものであり、その一般的な遺伝子組換え手法も知られている（欧州特許出願公開番号EP239400参照）。その既知の方法を用いて、本発明に有用な再構成ヒト抗体を得ることができる。

【0035】

キメラ抗体はヒト以外の哺乳動物由来抗体の可変領域とヒト抗体由来の定常領

域からなり、再構成ヒト抗体はヒト以外の哺乳動物由来抗体の相補性決定領域とヒト抗体由来のフレームワーク領域 (framework region; FR) および定常領域からなり、ヒト体内における抗原性が低下されているため、本発明の治療剤の有効成分として有用である。

【0036】

なお、キメラ抗体や再構成ヒト抗体に使用されるヒト抗体の定常領域として IgG が好ましく例示される。また、ヒト以外の哺乳動物抗体の相補性決定領域を連結するヒト抗体のフレームワーク領域は、相補性決定領域が良好な抗原結合部位を形成するものが選択される。

必要に応じ、再構成ヒト抗体の相補性決定領域が適切な抗原結合部位を形成するように抗体の可変領域のフレームワーク領域のアミノ酸を置換してもよい (Sato, K. et al., Cancer Res. (1993) 53, 851-856)。

【0037】

本発明に使用できる再構成ヒト抗体の好ましい具体例としては、再構成された WS-4 抗体 (再構成ヒト WS-4 抗体) が挙げられる (国際特許出願公開番号 WO96-02576 参照)。再構成ヒト WS-4 抗体は、マウス由来の WS-4 抗体の相補性決定領域を L 鎖についてはヒト抗体 REI のフレームワーク領域と、H 鎖についてはヒト抗体 VDH26 のフレームワーク領域 1-3 およびヒト抗体 4B4 のフレームワーク領域 4 と連結し、抗原結合活性を有するようにフレームワーク領域のアミノ酸残基を一部置換したものである。

【0038】

本発明には、IL-8 に結合し、IL-8 の活性を阻害するかぎり、抗体の断片等、抗体の各種修飾物を使用することができ、例えば、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fv または H 鎖と L 鎖の Fv を適当なリンカーで連結させたシングルチェーン Fv (scFv) を使用することができる。具体的には、これら抗体断片をコードする遺伝子を構築し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させればよい (例えば、Bird, R. E. et al., TIBTECH (1991) 9, 132-137 参照)。

【0039】

s c F v は、抗体のH鎖V領域とL鎖V領域を連結することにより得られる。このs c F vにおいて、H鎖V領域とL鎖V領域はリンカー、好ましくは、ペプチドリナーを介して連結される (H u s t o n, J. S. e t a l., P r o c. N a t l. A c a d. S c i. U. S. A. (1988) 85, 5879-5883)。s c F vにおけるH鎖V領域およびL鎖V領域は、上記抗体として記載されたもののいずれの由来であってもよい。V領域を連結するペプチドリナーとしては、例えばアミノ酸12-19残基からなる任意の一本鎖ペプチドが用いられる。

【0040】

s c F v をコードするDNAは、前記抗体のH鎖または、H鎖V領域をコードするDNA、およびL鎖または、L鎖V領域をコードするDNAを鋳型とし、それらの配列のうちの所望のアミノ酸配列をコードするDNA部分を、その両端を規定するプライマー対を用いてPCR法により増幅し、次いで、さらにペプチドリナー部分をコードするDNAの両端を各々H鎖、L鎖と連結されるように規定するプライマー対を組み合わせて増幅することにより得られる。

【0041】

また、一旦s c F v をコードするDNAが作製されれば、それらを含む発現ベクター、および該発現ベクターにより形質転換された宿主を常法に従って得ることができ、また、その宿主を用いて常法に従って、s c F v を得ることができる。

【0042】

この他に、ポリエチレングリコール等の各種分子と結合したり混合したりした抗IL-8抗体を使用することもできる。本願請求の範囲でいう「抗体」にはこれらの抗体修飾物も包含される。このような抗体修飾物を得るには、得られた抗体に化学的な修飾を施すことによっても得ることができるし、あるいはキメラ抗体や再構成ヒト抗体のように抗体のアミノ酸配列が修飾を受けているようなものは該修飾抗体をコードする遺伝子を導入した組換え細胞を公知の手段で培養増殖し、該細胞から得ることができる。



【0043】

これらの方法はこの分野においてすでに確立されている。前記の方法により得られる抗IL-8抗体は、塩析法、ゲル濾過法、アフィニティークロマトグラフィー法、メンブレンフィルター法等の通常の精製手段を利用して高純度に精製することができる。

【0044】

また、前記の方法により得られる抗IL-8抗体は、放射免疫測定法(RIA)、酵素免疫測定法(EIA、ELISA)、蛍光抗体法(immunofluorescence analysis)等の通常の免疫学的手段により、抗原を高感度かつ高精度で認識することを確認することができる。

【0045】

本発明の抗IL-8抗体を有効成分として含有する治療剤は、好ましくは非経口的に、例えば、静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射等により全身あるいは局部的に投与することができる。局所投与形態として外用剤、局所注射剤等が好適に実施し得る。さらに、少なくとも一種の医薬用担体または希釈剤とともに医薬組成物やキットの形態をとることができる。

【0046】

本発明の抗IL-8抗体を有効成分として含有する治療剤のヒトに対する有効投与量は、患者の病態、年齢あるいは投与方法により異なるが、適宜適当な量を選択することができる。例えば、例えば、一日につき体重1kgあたり0.001mgから1000mgの範囲で選ばれる。好適には体重1kgあたり0.01mgから10mgの範囲で選ばれる。前述の投与量は症状によっても異なり、これらの値に限定されるものでは勿論ない。投与回数としては通常一日一回ないし二回、二日ないし数日に一回もしくは一週ないし四週に一回の範囲で選ばれるがこれに限定されるものではない。

【0047】

本発明の抗IL-8抗体を有効成分として含有する治療剤は投与経路により異なるが、常法に従って製剤化することができ(Remington's Pharmaceutical Science, latest edition, Ma

rk Publishing Company, Easton, 米国)、医薬的に許容される担体や添加物を共に含むものであってもよい。

【0048】

このような担体および医薬添加物の例として、水、医薬的に許容される有機溶剤、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリル酸ナトリウム、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターチナトリウム、ペクチン、メチルセルロース、エチルセルロース、キサンタンガム、アラビアゴム、カゼイン、寒天、ポリエチレングリコール、ジグリセリン、グリセリン、プロピレングリコール、ワセリン、パラフィン、ステアリルアルコール、ステアリン酸、ヒト血清アルブミン、マンニトール、ソルビトール、ラクトース、医薬添加物として許容される界面活性剤等が挙げられる。

【0049】

実際の添加物は、本発明治療剤の剤形に応じて上記の中から適宜あるいは組み合わせで選ばれるが、もちろんこれらに限定するものではない。例えば、注射用製剤として使用する場合、精製された抗IL-8抗体を溶剤、例えば、生理食塩水、緩衝液、ブドウ糖溶液等に溶解し、それに、吸着防止剤、例えば、Tween 80、ゼラチン、ヒト血清アルブミン(HSA)等を加えたものであり、または、使用前に溶解再構成するために凍結乾燥したものであってもよい。凍結乾燥のための賦形剤としては例えばマンニトール、ブドウ糖等の糖アルコールや糖類を使用することができる。

【0050】

本発明の抗IL-8抗体を有効成分として含有する治療剤は、間接的原因に起因する急性肺損傷、例えば、急性呼吸促迫症候群および成人呼吸促迫症候群の治療剤として有用である。

【0051】

実施例

以下、実施例、参考例および実験例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

参考例1 ヒトIL-8に対するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマの作製

ヒトIL-8でマウスを免疫することにより、ヒトIL-8に対するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを得た(Ko, Y. et al., J. Immunol. Methods (1992) 149, 227-235)。具体的には、ヒトIL-8をBALB/Cマウスに免疫し、免疫が成立したマウスより脾細胞を取りだし、ポリエチレングリコールを使用する常法によりこの脾細胞をマウス骨髓腫細胞P3×63-Ag8.653と細胞融合させた。

【0052】

ヒトIL-8の中和活性を指標としたスクリーニングを行った結果、ハイブリドーマ細胞株WS-4を樹立した。このハイブリドーマが産生する抗体のH鎖およびL鎖のタイプを、マウスモノクローナル抗体アイソタイピングキット(アマシャムインターナショナルplc製)を用いて調べた。その結果、このハイブリドーマが産生する抗体は、 $\kappa$ 型L鎖および $\gamma$ 1型H鎖を有することが明らかになった。

なお、ハイブリドーマ細胞株WS-4は、Mouse hybridoma WS-4として、工業技術院生命工学技術研究所(茨城県つくば市東1丁目1番3号)に、平成8年4月17日に、FERMBP-5507としてブダペスト条約に基づき国際寄託された。

【0053】

参考例2 ヒトIL-8に対する再構成ヒト抗体の作製

再構成WS-4抗体を国際特許出願公開番号WO96-02576に記載の方法により得た。

参考例1で作製されたハイブリドーマWS-4から、常法により全RNAおよびmRNAを調製し、これらより一本鎖cDNAを合成した。ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法により、マウスWS-4抗体の可変(V)領域のDNAを増幅した。PCR法に使用するプライマーは、Jones, S. T. et al., Bio/Technology (1991) 9, 88-89に記載されたプライマーを用いた。PCR法で増幅したDNA断片を精製し、マウスカッパ型L鎖V領域をコードする遺伝子を含むDNA断片およびマウスガンマ型H鎖V領域をコ

ードする遺伝子を含むDNA断片を得た。これらのDNA断片を各々プラスミドpUC系クローニングベクターに連結し、大腸菌コンピテント細胞に導入して大腸菌形質転換体を得た。

【0054】

この形質転換体から上記プラスミドを得、プラスミド中のcDNAコード領域の塩基配列を常法に従い決定し、さらに各々のV領域の相補性決定領域(CDR)を決定した。

キメラWS-4抗体を発現するベクターを作製するため、マウスWS-4  $\kappa$  L鎖およびH鎖のV領域をコードするcDNAをそれぞれHEFベクターへ個別に挿入した。

再構成WS-4抗体を作製するために、CDR移植法によりマウスWS-4抗体のV領域CDRをヒト抗体へ移植した。CDRを移植した抗体が適切な抗原結合部位を形成するようにV領域のフレームワーク領域(FR)のアミノ酸を置換した。

このようにして作製した再構成ヒトWS-4抗体のL鎖およびH鎖の遺伝子を哺乳類細胞で発現させるために、各々の遺伝子を別々にHEFベクターに導入し、再構成ヒトWS-4抗体のL鎖またはH鎖を発現するベクターを作製した。

【0055】

これら二つの発現ベクターをCOS細胞に同時に挿入することにより、再構成ヒトWS-4抗体(hWS-4)を産生する細胞株を樹立した。この細胞株を培養して得られた再構成ヒトWS-4抗体のIL-8への結合能およびIL-8活性阻害能を、各々スキッチャードアナリシスおよびIL-8/好中球結合阻害試験にて調べた。その結果、再構成ヒトWS-4抗体は、ヒトIL-8の好中球への結合を阻害し、ヒトIL-8の生物活性を中和することが判明した。

【0056】

なお、再構成ヒトWS-4抗体のL鎖およびH鎖を含むプラスミドを有する大腸菌は、*Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (HEF-RVL $\alpha$ -g $\kappa$ ) および*Escherichia coli* JM109 (HEF-RVHg-g $\gamma$ 1) として、工業技術院生命工学技術研究所(茨城県つくば市東1丁目

1番3号)に、平成6年7月12日に、各々FERM BP-4738およびFERM BP-4741としてブダペスト条約に基づき国際寄託された。

【0057】

#### 実施例1

一群N=8の日本白色種ウサギ(雌、体重約2.5kg、購入先:三共ラボサ-ビス)に1羽あたりケタラル150mgを筋肉内注射し、並びにネンブター40mgを耳静脈より注射して麻酔した。麻酔下でウサギを仰臥位に固定し、ウサギの気管内にサーフロー留置針20G(テルモ)を経皮的に穿刺して外筒を留置した。このサーフロー留置針の外筒にボルヒール調整器セット(二液混合セット3.5mlニプロ医工)のフォークコネクターの噴出孔を接続した。

【0058】

フォークコネクターの2入口のうちの1口をエクステンションチューブにてMERA HFOベンチレーター(泉工医科工業株式会社)の出口に接続した。フォークコネクターの別の入口には、生理的食塩水にて濃度2.5KE/mlに懸濁したOK-432懸濁液(中外製薬)を1羽あたり2mlの量で2.5mlシンリンジに取り接続した。MERA HFOベンチレーターを圧力1.0kgf/cm<sup>2</sup>、Frequency 12Hzに調節して圧縮空気を噴出しつつ、OK-432懸濁液をウサギの気道内に注入した。この操作によりOK-432懸濁液は霧状になり、かつ圧力を伴って肺内に比較的均等に注入される。

【0059】

このOK-432投与の20分前にヒトIL-8に対するマウスWS-4抗体2.5mgあるいはコントロール抗体としてWS-4抗体と同一のサブタイプのマウス抗酵母グルタチオン還元酵素抗体2.5mgを4mlの生理的食塩水にて希釈し、それぞれの抗体を耳静脈より注射した。

OK-432投与36時間後に、大腸菌O55B5由来のリポポリサッカライドをリン酸緩衝液(PBS)に濃度3mg/mlに溶解し、投与量1mg/kg体重で耳静脈より注射した。このLPS投与の20分前にマウスWS-4抗体あるいはマウスコントロール抗体それぞれ2.5mgをOK-432投与時の抗体と同一の抗体を耳静脈より注射した。

【0060】

LPS投与後、大腿動脈から経時的に1mlの血液をヘパリン採血した。この血液を用いて動脈血酸素分圧（PaO<sub>2</sub>）ならびに動脈血二酸化炭素分圧（PaCO<sub>2</sub>）をRadiometer Copenhagen（型式名：ABL3、ACID BASE LABORATORY）にて測定した。

【0061】

LPS投与30分後から、WS-4抗体投与群ならびにコントロール抗体投与群の各群とも死亡し始めたが、5時間後の生存率はWS-4抗体投与群で62.5%、コントロール抗体投与群では37.5%であり、コントロール抗体投与群に比較してWS-4抗体投与群の方が統計学的に有意に延命効果を示した。生存曲線を図1に示す。

【0062】

コントロール抗体投与群の死亡例（N=5）とWS-4抗体投与群の生存例（N=5）の血液ガス分析の結果を図2に示す。コントロール抗体投与群の死亡例のPaO<sub>2</sub>はLPS投与15分後から低下し、低下したまま死亡した。一方、WS-4抗体投与群の生存例のPaO<sub>2</sub>は正常値を維持して生存した。すなわち、今回用いたこの実験系は、エンドトキシン（LPS）を静脈内に注射したのち低酸素血漿に至った場合は死亡するというような、敗血症症候群に起因する急性肺損傷と同様の経過をたどった。従って、このエンドトキシン誘導の急性肺損傷モデルにおいてWS-4抗体が有意な延命効果を示したことにより、WS-4抗体が敗血症症候群等の間接的原因に起因する急性肺損傷に有効な治療薬とであることが示された。

【0063】

【発明の効果】

抗IL-8抗体の投与によりエンドトキシン誘導の急性肺損傷が抑制された。この事実は、抗IL-8抗体が間接的原因に起因する急性肺損傷の治療剤として有用であることを示す。

【0064】

【図面の簡単な説明】

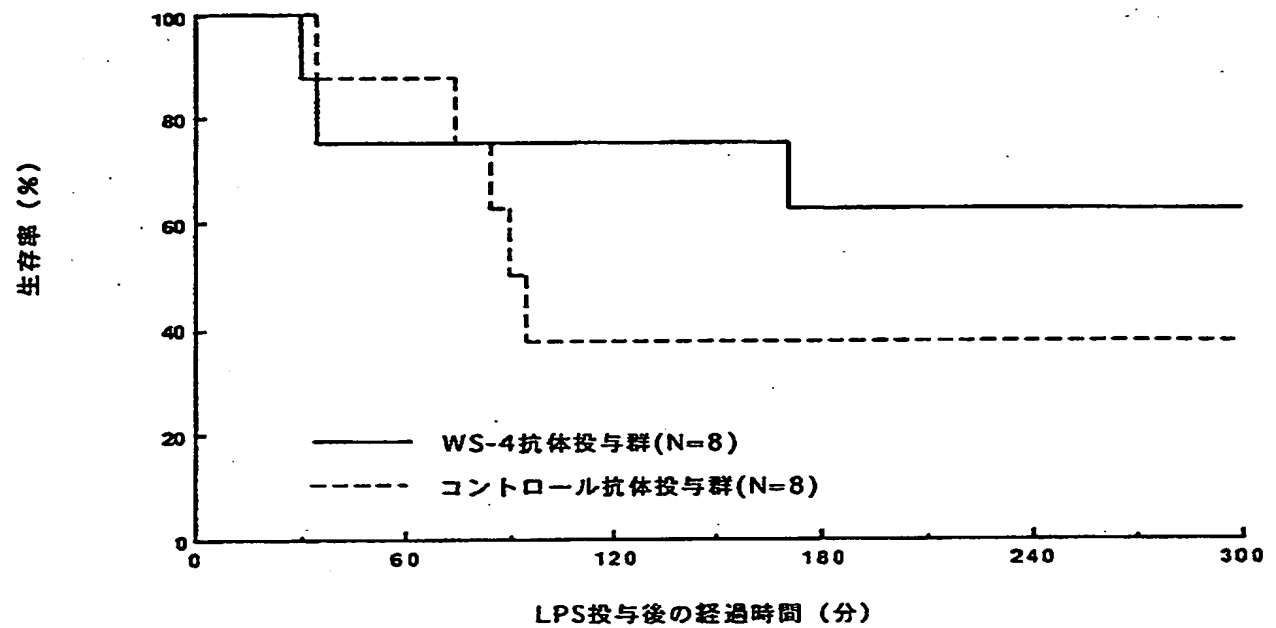
図1は間接的原因に起因する急性肺損傷モデルに対するWS-4抗体の延命効果をコントロール抗体と比較した生存曲線を示すグラフである。

図2は間接的原因に起因する急性肺損傷モデルにおいて、WS-4投与群のうち生存した例(N=5)とコントロール抗体投与群のうち死亡した例(N=5)の動脈血液ガス分析結果の経時的変化の比較を示すグラフである。

【書類名】 図面

【図1】

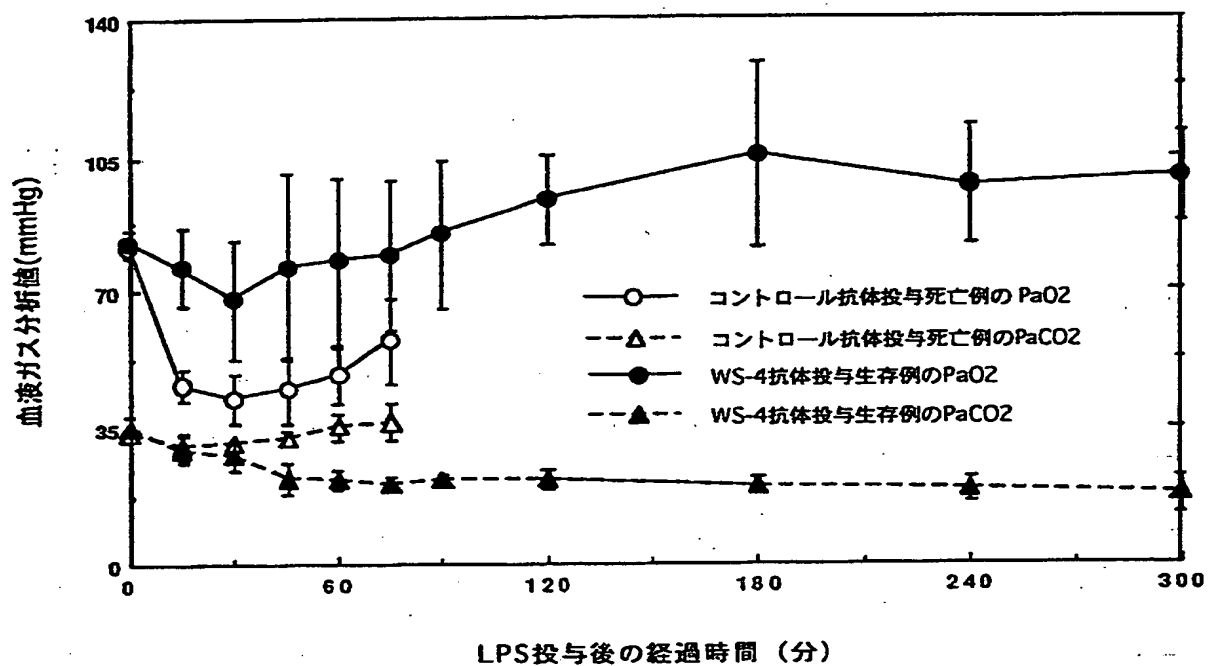
間接的原因に起因する急性肺損傷モデルに対するWS-4抗体の延命効果





【図2】

動脈血液ガス分析結果の経時的変化



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 新規な間接的原因に起因する急性肺損傷治療剤の提供。

【解決手段】 抗IL-8抗体を有効成分として含有する間接的原因に起因する急性肺損傷治療剤。

【選択図】 なし

特平 8-200918

【書類名】

職権訂正データ

【訂正書類】

特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

申請人

【識別番号】

000003311

【住所又は居所】

東京都北区浮間5丁目5番1号

【氏名又は名称】

中外製薬株式会社

特平 8-200918

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000003311]

1. 変更年月日 1990年 9月 5日  
[変更理由] 新規登録  
住 所 東京都北区浮間5丁目5番1号  
氏 名 中外製薬株式会社